



نانو ریزپوشانی فیکوسیانیین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) و استفاده از

نانوذرات حاصل در فرمولاسیون بستنی

رضا صفری<sup>۱\*</sup>، زینب رفتنی امیری<sup>۲</sup>، سهیل ریحانی پول<sup>۳</sup>، هادی غفاری<sup>۴</sup>

۱- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

۲- استاد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

گرگان، ایران.

۴- استادیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

## چکیده

## اطلاعات مقاله

## تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵

## کلمات کلیدی:

اسپیرولینا،

فیکوسیانیین،

نانوریزپوشانی،

بستنی،

خواص کیفی و حسی.

با توجه به نگرانی‌هایی که در زمینه استفاده از رنگ‌های مصنوعی در مواد غذایی مختلف وجود دارد، توجه به منابع دارای رنگ‌های طبیعی ضرورت می‌یابد. یکی از این منابع، جلبک اسپیرولینا است که محتوی رنگدانه آبی فیکوسیانیین است. هدف از تحقیق حاضر در مرحله اول استخراج این رنگدانه از جلبک مذکور به روش آنزیمی (لیزوزیم) و نانو ریزپوشانی آن بود. در مرحله دوم خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات بررسی شدند. نهایتاً فیکوسیانیین در دو فرم آزاد و نانو به فرمولاسیون بستنی اضافه و خواص کیفی و حسی محصول در مقایسه با شاهد ارزیابی گردید. نتایج نشان داد نانو ذرات تولیدشده دارای میانگین سایز ۳۹۷/۱ نانومتر هستند. بازده فرایند ریزپوشانی  $73/41 \pm 2/11$  درصد ثبت شد. مطابق تصاویر ثبت شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، ذرات نانو ریزپوشانی شده با ابعاد مختلف در گسترش میکروسکوپی پراکنده بودند؛ به طوری که ذرات در اندازه‌های مختلف (از قطر ۵۱/۴ تا ۲۲۱/۲ نانومتر) قابل مشاهده می‌باشند. نتایج رهایش نانوذرات در شرایط آزمایشگاهی نشان داد، در  $pH=1/2$ ، درصد رهایش فیکوسیانیین پائین است (۲ ساعت اول)؛ به طوری که در محدوده ۷ تا ۱۳ درصد نوسان دارد. اما بعد از این مرحله ( $pH=7/4$ )، درصد رهاسازی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشت (۴ ساعت دوم) و در زمان‌های ۳ و ۴ ساعت به ترتیب از ۳۵ به ۷۱ درصد رسید. استفاده از فیکوسیانیین خالص در فرمولاسیون بستنی، باعث بهبود شاخص‌های سفتی، درصد ذوب، بافت، شدت صمغیت، شدت کریستالی و شدت سردی شد؛ اما این شاخص‌ها در تیمار فرموله شده با فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده در سطح مطلوب‌تری گزارش شدند. شاخص رنگ در بستنی فرموله شده با فیکوسیانیین خالص در مقایسه با تیمار دارای فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده مطلوب‌تر و از مقبولیت بیشتری برخوردار بود. با توجه به ویژگی‌های فیکوسیانیین به ویژه فرم نانو ریزپوشانی شده، می‌توان از آن به عنوان رنگ بیولوژیک و بهبوددهنده خواص کیفی و حسی در انواع بستنی استفاده کرد.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.145

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.24.9

\* مسئول مکاتبات:

Safari1351@gmail.com

## ۱- مقدمه

نوشیدنی‌ها، انواع غذاها و شیرینی‌جات را محدود کرده‌اند. به همین دلیل توجه به رنگ‌های طبیعی جزء اولویت‌های اصلی محققین بوده است. در بین رنگ‌های طبیعی، رنگ آبی در صنعت نوشیدنی و شیرینی‌جات کاربرد گسترده‌ای دارد ولی به دلیل پایداری پائین رنگ‌های مذکور، کماکان از رنگ‌های مصنوعی استفاده می‌گردد. سیانوباکتر اسپیرولینا پلاتنسیس علاوه بر کاربرد در صنایع غذایی، به عنوان تولیدکننده رنگدانه آبی نیز حائز اهمیت است و رنگ آبی مذکور ناشی از وجود فیکوسیانیین می‌باشد. علت علاقه به استفاده تجاری از فیکوسیانیین، ماهیت پروتئینی و روش‌های آسان استخراج آن می‌باشد. به همین دلیل استفاده از فیکوسیانیین جهت افزایش امنیت غذایی همیشه مدنظر می‌باشد. علاوه بر این، فیکوسیانیین بدلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالا، قابلیت استفاده بعنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در انواع غذاها چرب از جمله روغن و ماهی را داشته و فساد شیمیایی ناشی از افزایش عدد پراکسید، تیوباریتوریک اسید و اسیدهای چرب آزاد را به تاخیر انداخته و از این طریق زمان ماندگاری مواد غذایی را افزایش می‌دهد [۷].

مطالعه در خصوص مقایسه رنگ‌های آبی شیمیایی و فیکوسیانیین از نظر حساسیت به نور و دما و همچنین استفاده از آن‌ها در انواع مواد غذایی نظیر آبنبات ژله‌ای، به عنوان پوشش شکلات‌های نرم و سفت و نوشیدنی‌های ساده نشان داده که فیکوسیانیین هر چند در محیط محلول آزمایشگاهی از پایداری کمتری در برابر نور و دما نسبت به رنگ‌های آبی متداول نظیر ایندیگو<sup>۱</sup> و گاردنیا<sup>۲</sup> برخوردار است اما به هنگام استفاده در مواد غذایی مذکور از پذیرش بیشتری خصوصاً در مورد آبنبات ژله‌ای و پوشش شکلات نرم برخوردار می‌باشد. فیکوسیانیین به هنگام قرارگرفتن در محلول آزمایشگاهی، پایداری بسیار پائینی در برابر نور و دما نشان می‌دهد. از طرف دیگر این رنگدانه در  $pH=3$  رسوب کرده و در دمای بالاتر از ۴۵ درجه و  $pH$  های ۵ و ۷، به سرعت دناتوره شده و رنگ آن تغییر می‌کند [۸].

ریزپوشانی، یکی از روش‌های موثر به منظور محافظت از انواع مواد موثره، نظیر اسانس‌ها، پپتیدهای زیست‌فعال، انواع آروما و طعم‌ها و همچنین رنگدانه‌های طبیعی می‌باشد. این فرآیند باعث (۱) افزایش دوام و بقاء، عدم تاثیر فاکتورهای محیطی

از مهم‌ترین فاکتورهای اصلی جهت ارزیابی کیفیت ماده غذایی می‌توان به رنگ، بو و طعم اشاره نمود. در این بین پارامتر رنگ مهم‌ترین عامل اصلی جهت پذیرش محصول توسط مشتری محسوب می‌گردد. در برخی از مواد غذایی از جمله نوشیدنی‌ها، انواع بستنی‌ها، ژله‌ها، شکلات‌ها و محصولات لبنی، فاکتور رنگ از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. رنگ‌های مشتق شده از منابع معدنی مثل کرومات سرب و سولفات مس باعث بروز مشکلات جدی در سلامت افراد می‌شوند. مصرف رنگ‌های مصنوعی به لحاظ وجود باقیمانده آن‌ها در غذا، آلودگی‌های زیست محیطی، پایداری پائین، حساسیت در برابر فاکتورهای محیطی و همچنین استفاده از مواد نه چندان مفید در فرمولاسیون آن‌ها، روز به روز در حال کاهش بوده و تولیدکنندگان مواد غذایی به استفاده از رنگ‌های طبیعی تمایل بیشتری نشان می‌دهند. رنگ‌های طبیعی به لحاظ اثرات مثبت بر سلامت و بهداشت مردم، اثرات تغذیه‌ای و دارویی، عدم مشکلات محیطی و بازار مناسب، پتانسیل جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی را دارند. آمارها نشان می‌دهد که مبادلات تجاری انجام گرفته در خصوص رنگ‌های طبیعی و طعم‌دهنده‌ها توسط اتحادیه اروپا در سال ۲۰۰۸، ۴۷۵ هزار تن معادل ۲۰۵۵ میلیون یورو بوده است. از مهم‌ترین رنگ‌های طبیعی می‌توان به کاروتنوئیدها، بتاکاروتن، لیکوپن، گزانتوفیل، لوتئین، فیکوبیلی پروتئین‌ها، آاناتو، فلاونوئیدها، آنتوسیانیین و کلروفیل اشاره نمود [۱-۳].

فیکوسیانیین یکی از رنگدانه‌های طبیعی با رنگ آبی است که از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس<sup>۱</sup> استخراج می‌شود و در محصولات غذایی مختلف از جمله آدامس، ژله، بستنی، شکلات، نوشیدنی و ... قابلیت استفاده به عنوان رنگدانه طبیعی را دارد. علاوه بر این خاصیت، فیکوسیانیین دارای خواص درمانی (اثرات مثبت بر تقویت سیستم ایمنی، خواص ضدالتهابی) و آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی نیز هست و به نوعی می‌توان مواد غذایی مختلف را با این رنگدانه غنی کرد [۴-۶].

سازمان غذا و داروی آمریکا<sup>۲</sup> و موسسه امنیت غذایی اروپا<sup>۳</sup> و برخی از سازمان‌های ملی، استفاده از رنگ‌های مصنوعی در

4. Indigo  
5. Gardenia

1. *Spirulina platensis*  
2. FDA  
3. European Food Safety Authority or EFSA

## ۲- مواد و روش

### ۲-۱- کشت میکروجلبک اسپیرولینا

نمونه خالص جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از آزمایشگاه جلبک‌شناسی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تهیه گردید. جهت کشت اسپیرولینا از محیط کشت زاروک<sup>۱</sup> با ترکیبات متفاوت استفاده و پس از کشت در مقیاس‌های کوچک‌تر (۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر)، کشت نهایی در حجم‌های ۵ و ۵۰ لیتر انجام گردید. ترکیبات محیط کشت مذکور شامل  $\text{NaHCO}_3$  ۸ گرم،  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ۰/۵ گرم،  $\text{NaNO}_3$  ۲/۵ گرم،  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ۰/۵ گرم،  $\text{NaCl}$  ۲ گرم،  $\text{MgSO}_4$  ۷ آب ۰/۲ گرم،  $\text{FeSO}_4$  ۲ آب ۰/۰۵ گرم و اوره ۰/۲ گرم بوده و pH و دما به ترتیب در محدوده ۸/۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. پس از کشت جلبک و قراردادن در برابر نور فلورسنت با شدت لوکس نوری مناسب (۳۵۰۰ تا ۸۰۰۰) و دوره زمانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، نمونه‌ها در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ روز قرار داده شدند. نمونه‌ها روزانه برای ۳ بار تکان داده شده تا رشد جلبک به خوبی انجام گیرد. پس از مشاهده بلوم جلبکی، نسبت به جمع‌آوری توده سلولی اقدام شد. این فرآیند با استفاده از صافی‌های ۱۰۰ و ۲۰ میکرونی انجام گردید که به ترتیب برای جداسازی ذرات بزرگتر و توده جلبک مورد استفاده قرار گرفتند. توده جمع‌آوری‌شده ۳ بار با آب مقطر استریل (جهت کاهش اثرات محیط کشت) شستشو داده شد. برای خشک‌کردن جلبک، نمونه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد آون (بهداد، ایران) برای مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند [۱۴-۱۶].

### ۲-۲- استخراج فیکوسیانیین به روش آنزیمی

در این روش، از آنزیم لیزوزیم جهت هضم و هیدرولیز آنزیمی جلبک به مقدار ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک جلبک استفاده شد. به منظور آغاز هیدرولیز آنزیمی، از لیزوزیم به همراه EDTA و سدیم آزید به مقدار ۱۰۰ میلی‌مولار (به عنوان عوامل ضد میکروبی) استفاده گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در حمام آب ۴۴ درجه سانتی‌گراد شیک شدند (حمام آب شیک‌دار، اختریان، ایران). پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Hettick، آلمان) شده

نظیر pH، نور و اکسیژن بر مواد ریزپوشانی‌شده (۲) کنترل رهایش مواد محصور در دیواره و در نتیجه تاثیر بیشتر بر کیفیت ماده غذایی (۳) حمل و نقل آسان مواد ریزپوشانی می‌شود [۹ و ۱۰]. در فرآیند ریزپوشانی، انواع مختلف کربوهیدرات، سلولز، صمغ‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و پلیمرهایی با درجه غذایی به عنوان ماده‌ی دیواره یا حامل استفاده می‌شوند. پوشش‌ها ممکن است به صورت منفرد و یا ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند. به هنگام استفاده ترکیبی از دیواره‌ها، اغلب از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و یا پلی‌ساکارید/پروتئین استفاده می‌گردد [۱۱].

هدف از تحقیق حاضر در مرحله اول استخراج رنگدانه فیکوسیانیین از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به روش آنزیمی (لیزوزیم) و نانوریزپوشانی آن بود. در مرحله دوم خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات (میانگین سایز ذرات، کرائی ریزپوشانی و رهایش در محیط مشابه دستگاه گوارش انسان) بررسی شدند. نهایتاً فیکوسیانیین در دو فرم آزاد و نانو ریزپوشانی‌شده به فرمولاسیون بستنی اضافه و خواص کیفی و حسی محصول ارزیابی گردید. در جوامع علمی داخل و بین الملل از فیکوسیانیین جهت غنی‌سازی و بهبود ویژگی‌های کیفی و حسی مواد غذایی استفاده نشده است. اما استفاده از پودر جلبک اسپیرولینا در برخی از مواد غذایی مانند کلوچه [۱۲] و ماست [۱۳] سابقه داشته است. در تحقیق صالحی‌فر و همکاران (۱۳۹۱)، از پودر جلبک اسپیرولینا در فرمولاسیون کلوچه استفاده گردید. غلظت‌های مورد استفاده شامل ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد بود و ویژگی‌های بافتی، رنگ و تغذیه‌ای کلوچه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان پروتئین، آهن و اسید چرب لینولنیک در کلوچه‌های غنی‌شده با جلبک به طور معنی‌داری افزایش داشته و برخی از پارامترهای فساد نظیر عدد پراکسید نیز کاهش داشته است. نتایج فاکتورهای حسی حاکی از رضایت‌بخش بودن تغییرات مذکور بوده است [۱۲]. در پژوهش آگوستینی و همکاران (۲۰۱۷)، از اسپیرولینا جهت غنی‌سازی ماست استفاده گردید. نتایج نشان داد که در غلظت ۱ درصد اسپیرولینا، تغییرات مشاهده‌شده در پارامترهای نظیر پروتئین کل، ویسکوزیته، جمعیت باکتری‌های لاکتیک بهتر از نمونه شاهد است اما میزان خاکستر، کربوهیدرات، رطوبت، چربی، اسید لاکتیک و pH فاقد اختلاف معنی‌دار با نمونه شاهد بودند [۱۳].

دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید [۹ و ۱۰].

## ۲-۵- کارایی فرآیند نانو ریزپوشانی

برای محاسبه کارایی فرآیند نانو ریزپوشانی (درصد) از فرمول زیر استفاده گردید [۹ و ۱۰]. در این رابطه  $F_1$  مقدار فیکوسیانیین فاقد پوشش و  $F_2$  مقدار فیکوسیانیین اضافه شده در ابتدای آزمایش است.

$$100 \times \frac{(F_1 - F_2)}{F_2} = \text{ضریب افزایش حجم (\%)}$$

## ۲-۶- درصد فراوانی و اندازه کپسول‌ها

تائید درصد فراوانی هسته، پوشش‌ها و اندازه آن‌ها با استفاده از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر (Shimadzu، ژاپن) و بر اساس روش تفرق نور لیزر انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون اولیه‌ای از فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده در آب مقطر تهیه شده و با استفاده از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر، متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی و با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [۹ و ۱۰]. در این رابطه  $n_i$  تعداد ذرات،  $d_i$  قطر میانگین ذرات و  $D$  قطر میانگین ذرات است.

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

## ۲-۷- بررسی مرفولوژی ذرات با استفاده از

### میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای تائید اندازه، مرفولوژی ذرات نانو ریزپوشانی شده، از میکروسکوپی الکترونی روبشی استفاده گردید. نمونه‌های خشک‌شده، بر روی پین‌های آلومینیومی چسبانده شده و با استفاده از یک لایه نازک رسانا (طلا و پالادیوم) پوشانده شدند. این عمل با کمک ابزاری به نام پوشش‌دهنده و با استفاده از میدان الکتریکی و گاز آرگون انجام شد. دستگاه SEM مورد استفاده مدل KYKY-EM3200 ساخت کشور چین بود. ولتاژ دستگاه ۲۶ کیلو ولت بوده و با استفاده از نیروی اتمی ساختار مورد بررسی قرار گرفت. برای لایه‌گذاری طلا و پالادیوم نیز از دستگاه KYKY مدل SBC-12 ساخت کشور چین استفاده شد [۹ و ۱۰].

و مایع رویی (رنگ آبی تیره) برای اندازه‌گیری رنگدانه جمع‌آوری شدند [۱۴ و ۱۵].

## ۲-۳- خالص‌سازی نسبی فیکوسیانیین

برای خالص‌سازی نسبی فیکوسیانیین از سولفات آمونیم با درجه اشباعیت ۴۰ درصد استفاده شد. این ماده به آرامی به محلول حاوی فیکوسیانیین اضافه و برای مدت یک ساعت هم زده شد. پس از قراردادن نمونه حاوی مخلوط فوق در مکان تاریک و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، فرآیند سانتریفوژ در دور ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. مایع بی‌رنگ رویی حاصل از سانتریفوژ، دور ریخته شده و به رسوب آبی رنگ (خلوص  $A_{620}/A_{280} = 1/135$  و غلظت  $3/751$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، مقداری محلول بافر فسفات ( $pH=7$ ) اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۷ و ۱۸].

## ۲-۴- نانو ریزپوشانی کردن فیکوسیانیین

به منظور افزایش پایداری پیگمان فیکوسیانیین، از روش ریزپوشانی در جهت تولید هسته و پوشش در مقیاس نانومتر استفاده گردید. برای انجام فرآیند، از پوشش ترکیبی پلی‌ساکاریدی (مالتودکسترین  $DE=20$ ) و پروتئینی (کازئینات سدیم) با نسبت ۱:۱ استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد و به لحاظ حلالیت این ماده در آب، از تیمار حرارتی استفاده نشد. جهت تهیه پوشش دوم، ابتدا سوسپانسیونی از کازئینات - سدیم در آب مقطر تهیه (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) و با قرار دادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه برای مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن تهیه گردید. محلول حاوی کازئینات (پس از کاهش دما به ۲۵ درجه) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه شد و برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم فیکوسیانیین استخراج شده از روش آنزیمی به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه شده و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور بالا (اولتراتوراکس، JKa، ایتالیا) با

## ۲-۸- بررسی رهایش فیکوسیاینین نانو ریزپوشانی شده در شرایط آزمایشگاهی

به منظور ارزیابی روند آزادسازی و رهایش فیکوسیاینین نانو ریزپوشانی شده، ابتدا دو محلول مشابه مایع اسیدی معده و مایع خنثی روده کوچک تهیه شد. محلول اول و دوم به ترتیب حاوی اسید کلریدریک و بافر فسفات سدیم بوده و pH آن‌ها در محدوده ۱/۲ و ۷/۴ تنظیم شد. بعد از این مرحله، پودر فیکوسیاینین نانو ریزپوشانی شده به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم (۱۰۰ میلی‌گرم فیکوسیاینین خالص به عنوان هسته که در ۴۰۰ میلی‌گرم از نسبت مساوی مالتودکسترین و کازئینات سدیم پوشش‌دار شده بود) به محلول اول اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از این مرحله، pH محلول به ۷/۴ افزایش داده شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه، عمل شیک‌کردن ادامه یافت. تغییرات غلظت فیکوسیاینین رهاسازی شده، در هر ۶۰ دقیقه، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد [۹].

## ۲-۹- استفاده از فیکوسیاینین در فرمولاسیون بستنی

به منظور ارزیابی تاثیر فیکوسیاینین بر خواص کیفی بستنی، مقدار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای فرم خالص و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای فرم نانو ریزپوشانی شده، به آمیخته بستنی (قبل از انجماد) اضافه شد. انتخاب این غلظت بر اساس پیش‌تست‌های انجام‌شده و مطالعه سایر تحقیقات در خصوص استفاده از رنگدانه‌های جلبکی در مواد غذایی بوده است [۱۹].

## ۲-۱۰- تهیه بستنی

تهیه بستنی بر اساس روش آکالین و اریسیر (۲۰۰۸) انجام شد [۲۰]. ترکیبات مورد استفاده شامل ۲۸ درصد خامه، ۱۶ درصد شکر، ۵/۵ درصد شیر خشک بدون چربی، ۰/۴ درصد ماده پایدارکننده (ثعلب)، ۰/۱ درصد وانیل و ۵۰ درصد شیر تازه (۱/۵ چربی) بود. بعد از توزین مواد اولیه، ابتدا شیر تا دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد. سپس شیر و خامه با استفاده از همزن دستی به مدت ۱ دقیقه یکنواخت و پس از آن، سایر اجزاء (شکر، پودر شیر خشک و ثعلب) به مخلوط افزوده و به مدت ۵ دقیقه با همزن مکانیکی هم‌زده شدند. مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پاستوریزه و در نهایت به کمک ماده سرمازا

(یخ و آب‌نمک) تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد خنک شد. سپس مرحله رساندن، در دمای ۶-۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. رنگدانه فیکوسیاینین (فرم آزاد و نانو ریزپوشانی شده) و سایر مواد طعم‌دار مثل وانیل نیز به آمیخته اضافه گردید. مخلوط در دستگاه بستنی‌ساز (Gel-Matic، ایتالیا) غیر مداوم به مدت ۳۰ دقیقه مرحله انجماد را در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد سپری کرد و در نهایت بستنی در ظروف پلاستیکی درب‌دار از جنس پلی اتیلن بسته‌بندی شد. محصول تولید شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد جهت انجام مرحله سفت‌شدن قرار داده شد.

## ۲-۱۱- ارزیابی خصوصیات کیفی بستنی تولید شده

### ۲-۱۱-۱- PH

برای اندازه‌گیری pH در آمیخته، از pH متر دیجیتال (HM-20S، ژاپن) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد [۲۱].

### ۲-۱۱-۲- ویسکوزیته

ویسکوزیته آمیخته با استفاده از ویسکومتر چرخشی بروکفیلد مدل HDV-Pro+ در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد که به کمک مخلوط آب و یخ ثابت نگه داشته می‌شد به مدت ۶۰ ثانیه روی مخلوط بستنی با حجم ۶۰۰ میلی‌گرم با اسپندل L4 و سرعت ۵۰ دور در دقیقه انجام شد [۲۲].

### ۲-۱۱-۳- ضریب افزایش حجم

افزایش حجم به روش وزنی با مقایسه حجم مشخصی از مخلوط بستنی قبل از انجماد ( $M_1$ ) و بعد از انجماد ( $M_2$ ) و محاسبه درصد اختلاف آن‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد [۲۳].

$$\text{ضریب افزایش حجم (\%)} = [(M_1 - M_2) / M_2] \times 100$$

### ۲-۱۱-۴- سفتی بافت

جهت تعیین سفتی نمونه‌ها با قطر ۵۰ میلی‌متر بعد از طی مرحله سفت‌شدن از دستگاه آنالیز بافت (Brookfield، آمریکا) با پروب استوانه‌ای ۵ میلی‌متر، سرعت نفوذ ۱ میلی‌متر بر ثانیه و مقدار نفوذ ۱۰ میلی‌متر استفاده شد [۲۴].

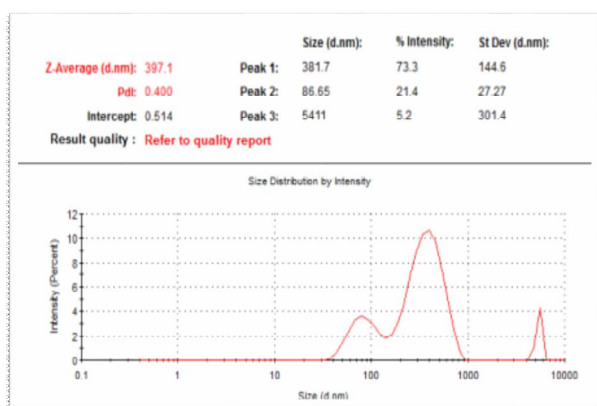
### ۲-۱۱-۵- مقدار ذوب

نمونه بستنی به مقدار ۳۰ گرم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی یک صفحه فلزی مشبک در دهانه ارلن مایر در داخل انکوباتور قرار داده شد و وزن مقدار بستنی ذوب‌شده بر حسب

راندمان نانو ریزپوشانی فیکوسیانیین ۷۳/۴۱ درصد بوده که نشان از کارایی بالای این روش در ریزپوشانی فیکوسیانیین می‌باشد. نتایج اندازه ذره و تراکم فیکوسیانیین و پوشش‌های مورد استفاده که تحت فرآیند نانو ریزپوشانی قرار گرفتند در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق جدول و شکل ۱، اندازه پوشش‌های حاوی فیکوسیانیین ۳۹۷/۱ نانومتر بوده است. در شکل ۱ سه پیک کاملاً مجزا مشاهده می‌شود. پیک ۱ نمایانگر فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و کازئینات سدیم است که اندازه و تراکم آن به ترتیب ۳۸۱/۷ نانومتر و ۷۳/۳ درصد می‌باشد و بیشترین تراکم را بخود اختصاص داده که نشان از درصد بالایی از فیکوسیانیین می‌باشد که به درستی نانو ریزپوشانی شده است. پیک ۲ نشان‌دهنده فیکوسیانیین آزاد است که هر چند اندازه آن در حد نانومتر می‌باشد (۸۶/۶۵ نانومتر) اما پوششی آن را احاطه نکرده است. تراکم این فرم از فیکوسیانیین ۲۱/۴ درصد ثبت شد. در حقیقت این پیک نشان‌دهنده نانوذره فیکوسیانیین می‌باشد. در پیک ۳ به ذراتی اشاره شده که اندازه آن‌ها در حد میکرومتر و نشان از باقیمانده موادی است که تحت تاثیر نانو ریزپوشانی قرار نگرفتند. اندازه متوسط این ذرات ۵/۴۱۱ میکرومتر و تراکم آن‌ها نیز ۵/۲ درصد ثبت شده است.

**Table 1** Physical characteristics of nanoencapsulated phycocyanin

Physical characteristics	
Encapsulation efficiency (%)	73.41±2.11
Average particle size (nm)	397.1±1.96



**Fig 1** Results of nanoencapsulated phycocyanin size using particle sizer device

مورفولوژی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده که با میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شده در شکل ۲ نشان داده شده است.

درصدی از نمونه اولیه بعد از گذشت ۴۰ دقیقه اندازه‌گیری گردید [۲۵].

## ۲-۱۱-۶-آزمون‌های حسی بستنی

ارزیابی حسی بستنی دارای رنگدانه فیکوسیانیین خالص و نانو ریزپوشانی‌شده، در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد و با آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای توسط ۵ آموزش‌دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات مورد بررسی شامل رنگ، طعم، شدت سردی، شدت صمغیت، سفتی، شدت کریستالی و سرعت ذوب بودند [۲۶ و ۲۷]. اساس امتیازدهی در روش ارزیابی حسی به صورت ذیل بوده است:

سردی: احساس سرما بین زبان و سقف دهان در حین ذوب شدن بستنی (احساس سردی زیاد: امتیاز پایین).

سفتی: فشار وارد شده به سقف دهان در حین خوردن نمونه (هرچه نیروی وارد شده بیشتر: امتیاز پایین‌تر).

شدت کریستالی: مرتبط با حضور کریستال یخ بین زبان و سقف دهان بلافاصله پس از گذاشتن نمونه در دهان (هرچه نمونه صاف‌تر و احساس کریستال کمتر: امتیاز بالاتر).

صمغی بودن: احساس حالت صمغی روی زبان بعد از بلعیدن نمونه (هر چه احساس صمغی بودن بیشتر: امتیاز پایین‌تر).

سرعت ذوب شدن: سرعت آب شدن نمونه پس از فشار دادن آن بین کام و زبان (سرعت پایین آب شدن: امتیاز بالاتر).

## ۲-۱۲-تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه<sup>۷</sup> آنالیز و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن<sup>۸</sup> در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شد.

## ۳- نتایج

### ۳-۱-خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیکوسیانیین

#### نانو ریزپوشانی شده

نتایج آزمایشات مربوط به راندمان فرآیند و اندازه متوسط فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده در جدول ۱ ارائه شده است.

7. One-Way ANOVA

8. Duncan



به طوری که ذرات در اندازه‌های مختلف (از قطر ۵۱/۴ نانومتر تا ۲۲۱/۲ نانومتر) قابل مشاهده می‌باشند. نتایج رهایش فیکوسیانین نانو ریزپوشانی شده در محلول‌های شیبیه‌سازی شده با معده ( $\text{pH}=1/2$ ) و روده کوچک ( $\text{pH}=7/4$ ) در جدول ۲ نشان داده شده است. در  $\text{pH}=1/2$ ، درصد رهایش فیکوسیانین پائین بوده (۲ ساعت اول) به طوری که در محدوده ۷ تا ۱۳ درصد نوسان دارد. اما بعد از این مرحله ( $\text{pH}=7/4$ )، درصد رهاسازی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشته (۴ ساعت دوم) و در زمان‌های ۳ و ۴ ساعت به ترتیب از ۳۵ به ۷۱ درصد رسید. بعد از این مرحله میزان رهاسازی فیکوسیانین، روند ثابتی بخود گرفت. نتایج رهاسازی فیکوسیانین در زمان‌های اولیه نسبت به زمان‌های ۴ تا ۶ ساعت معنی‌دار بوده است ( $p < 0/05$ ).

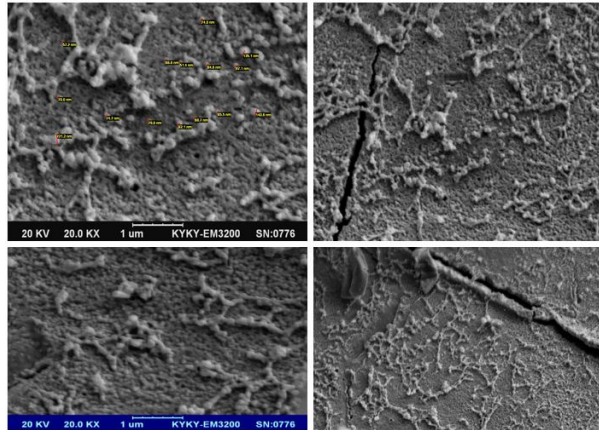


Figure 2: Density of nanoencapsulated phycocyanin of different sizes under scanning electron microscopy

مطابق این شکل (مجموع اشکال)، ذرات نانو ریزپوشانی شده با ابعاد مختلف در گسترش میکروسکوپی پراکنده است؛

**Table 2** Release rate of nano-coated phycocyanin in simulated solutions with gastrointestinal conditions

pH	Time (hour)	Release of phycocyanin (%)
1.2	1	7.41±0.55 <sup>d</sup>
	2	13.52±1.11 <sup>c</sup>
	3	35.20±1.45 <sup>b</sup>
7.4	4	71.19±2.07 <sup>a</sup>
	5	70.35±2.13 <sup>a</sup>
	6	68.25±1.32 <sup>a</sup>

\*Different letters indicate a significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).

ریزپوشانی شده دارای بیشترین مقدار ویسکوزیته بوده ( $1140 \pm 10/05$ ) سانتی‌پواز یا میلی‌پاسکال) که این امر نشان‌دهنده آن است که پوشش‌های مورد استفاده بر خواص ویسکوزیته بستنی تاثیرگذار بوده‌اند. تیمارهای حاوی فیکوسیانین خالص و تیمار شاهد به ترتیب دارای ویسکوزیته  $960 \pm 5/05$  و  $870 \pm 5/05$  سانتی‌پواز بودند. درصد افزایش حجم یا اورران در تیمار شاهد، فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی شده به ترتیب  $41/45 \pm 0/45$  درصد،  $41/17 \pm 0/11$  درصد و  $39/65 \pm 0/24$  گزارش شد. مطابق جدول ۳، کمترین میزان سفیدی بر حسب نیوتن در تیمار حاوی فیکوسیانین نانو ریزپوشانی شده با  $15/23$  نیوتن و بیشترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با مقدار  $18/78$  نیوتن بوده و به نظر می‌رسد اضافه کردن فیکوسیانین و پوشش‌ها باعث نرم شدن بافت بستنی شده‌اند. تغییرات سفیدی در تیمارهای مختلف معنی‌دار بوده است ( $p < 0/05$ ). درصد ذوب بستنی بین  $73/28$  تا  $76/45$  متغیر و بیشترین و کمترین مقدار آن نیز به ترتیب مربوط به تیمار شاهد و فیکوسیانین نانو ریزپوشانی شده بود

### ۳-۲- تاثیر فیکوسیانین خالص و نانو

#### ریزپوشانی شده بر خواص کیفی بستنی

به منظور ارزیابی تاثیر فیکوسیانین بر پارامترهای کیفی و شاخص‌های حسی بستنی، از تیمارهای شاهد (بدون رنگدانه) و فرم‌های خالص و نانو ریزپوشانی شده رنگدانه به مقدار ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به آمیخته بستنی (قبل از انجماد) اضافه شد و محصول تهیه شده طبق استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت مورد نظر بر اساس پیش‌تست‌های انجام شده و مشاهده رنگ ایجاد شده و همچنین سایر مطالعات انجام شده در خصوص استفاده از رنگدانه‌های مختلف در مواد غذایی تعیین شد. نتایج پارامترهای فیزیکی و حسی آمیخته و بستنی حاوی فیکوسیانین خالص، نانو ریزپوشانی شده و نمونه شاهد در جداول ۳ و ۴ ارائه شده است. مقادیر pH در شاهد، فیکوسیانین خالص و نانو ریزپوشانی شده به ترتیب  $6/70 \pm 0/01$ ،  $6/74 \pm 0/10$  و  $6/67 \pm 0/01$  ثبت شد. تیمار حاوی فیکوسیانین نانو

( $p < 0.05$ ). با اضافه نمودن فیکوسیانیین و پوشش های مالتودکسترین و آب پنیر تغلیظ شده، درصد ذوب بستنی به طور معنی داری کاهش داشته است ( $p < 0.05$ ).

**Table 3** Results of stiffness factors and melting rate in control ice cream (without phycocyanin pigment) and with pure phycocyanin and nanocoated at different times

Phycocyanin forms	Time (day)	Stiffness (N)	Melting amount (%)
Control	15	17.24±0.43 <sup>b</sup>	75.18±0.21 <sup>b</sup>
	30	18.45±0.32 <sup>a</sup>	75.33±0.36 <sup>b</sup>
	45	18.78±0.21 <sup>a</sup>	76.45±0.17 <sup>a</sup>
Pure	15	17.21±0.45 <sup>b</sup>	74.66±0.21 <sup>c</sup>
	30	17.35±0.33 <sup>b</sup>	75.21±0.21 <sup>b</sup>
	45	17.55±0.19 <sup>b</sup>	75.11±0.21 <sup>b</sup>
Nanoencapsulated	15	15.23±0.42 <sup>c</sup>	72.28±0.21 <sup>c</sup>
	30	15.45±0.30 <sup>c</sup>	73.30±0.21 <sup>d</sup>
	45	15.63±0.44 <sup>c</sup>	73.25±0.21 <sup>d</sup>

\*Different letters indicate a significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).

را بخود اختصاص داده و با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار بوده است ( $p < 0.05$ ). شدت کریستالی بودن، همچنین شدت صمغیت و سردی بستنی در تیمارهای حاوی فیکوسیانیین کمتر از تیمار شاهد بوده ( $p < 0.05$ ) و در نتیجه امتیازات کسب شده برای تیمارهای حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده و خالص بیشتر از تیمار شاهد بوده است. با در نظر گرفتن تمامی فاکتورهای حسی مورد بررسی، تیمار حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده در زمانهای مورد بررسی از مقبولیت قابل قبولی برخوردار بوده؛ هر چند که فاکتور رنگ در تیمار حاوی فیکوسیانیین خالص بهتر از سایر تیمارها گزارش شده است.

نتایج شاخص های حسی (جدول ۴) نشان داد که فاکتور رنگ در تیمار حاوی فیکوسیانیین خالص بیشترین امتیاز را بخود اختصاص داده و بعد از آن تیمارهای فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده و شاهد قرار دارند ( $p < 0.05$ ). استفاده از پوشش های اختصاصی جهت نانو ریزپوشانی کردن فیکوسیانیین، باعث کاهش رنگ آبی تیره فیکوسیانیین شده و در مقایسه با فیکوسیانیین خالص از مقبولیت کمتری برخوردار بوده است. طعم بستنی در تیمارهای حاوی فیکوسیانیین (خالص و نانو) بهتر از تیمار شاهد بوده است ( $p < 0.05$ ). به لحاظ نرم تر شدن بافت بستنی در تیمارهای حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده، این تیمار از نظر پارامتر سفتی، بیشترین امتیاز

**Table 4** Results of sensory parameters in control ice cream (without phycocyanin pigment) and with pure phycocyanin and nanocoated at different times

Phycocyanin forms	Time (day)	Color	taste	Hardness	Crystalline intensity	Gumminess	Cool intensity	General acceptance
Control	15	4.23±0.17 <sup>c</sup>	4.21±0.21 <sup>ab</sup>	4.12±0.1 <sup>c</sup>	3.22±0.2 <sup>d</sup>	4.34±0.18 <sup>bc</sup>	3.65±0.15 <sup>e</sup>	4.11±0.13 <sup>d</sup>
	30	4.22±0.13 <sup>f</sup>	4.11±0.19 <sup>ab</sup>	3.89±0.13 <sup>d</sup>	3.13±0.16 <sup>d</sup>	3.67±0.11 <sup>d</sup>	3.34±0.31 <sup>f</sup>	3.65±0.15 <sup>e</sup>
	45	4.2±0.15 <sup>f</sup>	3.95±0.11 <sup>bc</sup>	3.65±0.22 <sup>e</sup>	2.87±0.11 <sup>e</sup>	3.33±0.31 <sup>e</sup>	2.73±0.24 <sup>g</sup>	3.23±0.11 <sup>f</sup>
Pure	15	4.95±0.21 <sup>a</sup>	4.33±0.33 <sup>a</sup>	4.45±0.16 <sup>b</sup>	4.32±0.14 <sup>ab</sup>	4.67±0.17 <sup>a</sup>	4.12±0.21 <sup>c</sup>	4.65±0.16 <sup>b</sup>
	30	4.91±0.18 <sup>a</sup>	4.36±0.17 <sup>a</sup>	4.43±0.22 <sup>b</sup>	4.21±0.11 <sup>bc</sup>	4.54±0.14 <sup>ab</sup>	3.91±0.19 <sup>d</sup>	4.42±0.17 <sup>c</sup>
	45	4.93±0.13 <sup>a</sup>	4.31±0.15 <sup>a</sup>	4.45±0.25 <sup>b</sup>	4.13±0.14 <sup>c</sup>	4.33±0.22 <sup>bc</sup>	3.75±0.12 <sup>e</sup>	4.11±0.25 <sup>d</sup>
Nanoencapsulated	15	4.75±0.1 <sup>b</sup>	4.55±0.11 <sup>a</sup>	4.8±0.13 <sup>a</sup>	4.57±0.11 <sup>a</sup>	4.84±0.13 <sup>a</sup>	4.73±0.11 <sup>a</sup>	4.85±0.15 <sup>a</sup>
	30	4.7±0.22 <sup>c</sup>	4.35±0.35 <sup>a</sup>	4.76±0.11 <sup>a</sup>	4.51±0.15 <sup>a</sup>	4.72±0.14 <sup>a</sup>	4.66±0.12 <sup>a</sup>	4.65±0.1 <sup>b</sup>
	45	4.64±0.32 <sup>d</sup>	4.32±0.42 <sup>a</sup>	4.71±0.26 <sup>a</sup>	4.46±0.32 <sup>a</sup>	4.55±0.33 <sup>ab</sup>	4.58±0.21 <sup>ab</sup>	4.53±0.13 <sup>b</sup>

\*Different letters indicate a significant difference between the data ( $p < 0.05$ ).

نشان از کارایی بالای این فرآیند می باشد. ذرات نانو ریزپوشانی شده به شکل کروی منظم بوده و بالاترین پیک در نتایج پارامتریکل سایزر مربوط به پوشش ترکیبی مالتودکسترین و کازئینات سدیم با تراکم و اندازه ۷۳/۳ درصد و ۳۸۱/۷ بوده و اندازه بزرگترین ذره نانو ریزپوشانی شده در گسترش

## ۴- بحث و نتیجه گیری

برای نانو ریزپوشانی کردن فیکوسیانیین در این مطالعه، از نسبت برابر مالتودکسترین و کازئینات سدیم استفاده و نسبت پوشش ها به هسته نیز ۴ به ۱ بوده است. بر اساس نتایج این مطالعه، راندمان نانو ریزپوشانی فیکوسیانیین، ۷۳/۴۱ بوده که



است. نتایج تحقیق مذکور با پژوهش حاضر کاملاً همخوانی دارد. در این پژوهش شکل میکروکپسول‌ها به صورت گرد و کروی و اندازه آن‌ها نیز بین ۱۰۰۰-۹۰۰ میکرومتر ثبت شد. این ذرات از نظر شکل شبیه نانوذرات تولیدشده در تحقیق حاضر هستند اما اندازه ذرات در پژوهش جاری، به مراتب کوچک‌تر می‌باشد (۲۲۱/۲-۵۱/۴ نانومتر). کارایی و میزان لودینگ فیکوسیاینین در مطالعه مذکور به ترتیب ۶۰/۹ درصد و ۲۲/۱ درصد گزارش شد که در مقایسه با تحقیق حاضر کمتر می‌باشد [۳۱].

نتایج رهایش فیکوسیاینین در شرایط شبیه‌سازی شده معده (pH=۱/۲) و روده (pH=۷/۴) نشان داد که درصد رهایش فیکوسیاینین در pH=۱/۲ در ۲ ساعت اول پائین بوده (۱۳/۵۲ درصد) ولی با تغییر pH به ۷/۴، رهایش افزایش یافته به طوری که در زمان ۴ ساعت به ۷۱/۱۹ درصد می‌رسد. تغییر pH از اسیدی به خنثی باعث افزایش نفوذپذیری دیواره پوشش‌ها شده و در نتیجه درصد رهایش فیکوسیاینین نیز افزایش می‌یابد. نوع پوشش مورد استفاده در رهاسازی هسته تاثیر گذار خواهد بود. وقتی از پوشش پروتئینی به تنهایی استفاده گردد شرایط اسیدی معده باعث هیدرولیز پروتئین و در نتیجه باعث رهایش هسته خواهد شد. اما به هنگام استفاده ترکیبی پروتئین و پلی‌ساکارید، روند رهایش کندتر می‌گردد. نتایج رهایش فیکوسیاینین در گزارش سوزری و همکاران (۲۰۱۷) بدین صورت بوده که آزادسازی سریع در ۲ ساعت اولیه در شرایط اسیدی رخ داده (۵۳ درصد) و بعد از آن، روند رهایش در شرایط قلیایی به کندی صورت گرفته و تقریباً ثابت می‌گردد (۵۷ درصد) [۳۱]. نتایج مذکور با مطالعه حاضر مغایرت دارد. یان و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که روند رهاسازی فیکوسیاینین از پوشش‌ها در محیط اسیدی کندتر از شرایط قلیایی است. به طوری که در چنین شرایطی، درصد رهاسازی در تیمار ترکیبی، ۹۵/۰۲ درصد بوده که در ۴ ساعت اول رخ داده است. برای تیمار آلژینات به تنهایی، میزان رهاسازی در ۳ ساعت اول، ۷۴/۱۴ درصد ثبت شد [۹]. درصد رهاسازی در هر دو تیمار، نسبت به تیمار ترکیبی مورد استفاده در تحقیق حاضر بیشتر بوده که علت این امر به غلظت و ماهیت پوشش‌های مورد استفاده مرتبط می‌باشد.

به‌منظور ارزیابی تاثیر فیکوسیاینین بر پارامترهای کیفی و شاخص‌های حسی بستنی از غلظت ۱۰۰ برای فیکوسیاینین خالص و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای فیکوسیاینین نانو ریزپوشانی‌شده استفاده شد و پارامترهای مختلف مورد بررسی

میکروسکوپ الکترونی نیز ۲۲۱/۲ نانومتر ثبت شده است. دوی و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه خود از مالتودکسترین و کارآگینان (به نسبت ۹ به ۱) جهت ریزپوشانی کردن فیکوسیاینین استفاده کردند. نتایج نشان داد که ریزپوشانی کردن فیکوسیاینین باعث افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظت آن در برابر فرآیند اکسیداسیون، مقاومت در برابر گرما و مواد زیست‌فعال شده و به هنگام استفاده ترکیبی از پوشش‌ها، محصول نهایی تولیدشده در برابر اکسیداسیون حفظ می‌شود. در حالی که در نمونه‌های دارای پوشش منفرد، این ویژگی چندان مشهود نمی‌باشد. تحقیق مذکور همچنین نشان داد که شکل میکروسکوپ الکترونی ذرات به صورت کروی منظم بوده و به هنگام افزایش غلظت کارآگینان و یا مالتودکسترین، شکل منظم کروی تغییر می‌کند [۲۸]. در مطالعه حاضر از نسبت مساوی مالتودکسترین و کازئینات سدیم جهت ریزپوشانی کردن فیکوسیاینین استفاده و شکل میکروسکوپی ذرات نیز بصورت کروی منظم ثبت شد. کارآگینان به دلیل ماهیت صمغی و ویسکوزیته بالا، باعث تشکیل اشکال نامنظم از ذرات شده در حالی که مالتودکسترین و کازئینات دارای ویسکوزیته کم‌تری می‌باشند. برای انجام فرآیند ریزپوشانی و تولید ذرات به شکل نانو، در اغلب موارد نسبت پوشش به هسته از ۲ تا ۱۰ متغیر بوده تا فرآیند به خوبی انجام گیرد (۱۰). دوی و همکاران (۲۰۱۷) از پوشش‌های مختلف شامل آلژینات و کارآگینان در ترکیب با مالتودکسترین به منظور ریزپوشانی فیکوسیاینین استفاده کردند. روش مورد استفاده جهت خشک‌کردن نهایی فریزدرایر بود (مشابه روش مورد استفاده در تحقیق حاضر). نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی آلژینات و مالتودکسترین نتایج بهتری را به همراه داشته و تثبیت رنگ آبی فیکوسیاینین نسبت به سایر تیمارها بیشتر و بیشترین میزان محصول و کارایی فرآیند ریزپوشانی (به ترتیب ۸۳/۰۹ و ۳۵/۹۱ درصد) نیز مربوط به این تیمار بوده است [۲۹]. کارایی فرآیند ریزپوشانی در مطالعه مذکور کمتر از تحقیق حاضر گزارش شد. کارایی فرآیند ریزپوشانی تحت تاثیر نوع پوشش مورد استفاده، ویژگی‌های هیدروفوبی و هیدروفیلی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی قرار می‌گیرد. در مطالعه هولکم و همکاران (۲۰۱۶) کارایی ریزپوشانی، ۸۹/۷۱ درصد گزارش شده که بیشتر از مطالعه حاضر می‌باشد [۳۰]. در مطالعه سوزری و همکاران (۲۰۱۷)، به ریزپوشانی کردن فیکوسیاینین با کیتوزان اشاره شد و نتایج نشان داد که کیتوزان در غلظت ۳ درصد دارای بیشترین راندمان ریزپوشانی بوده

قرار گرفتند. مقادیر pH در تیمارهای مورد بررسی بین ۶/۶۷ تا ۶/۷۴ متغیر و کمترین و بیشترین مقادیر مربوط به تیمارهای حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده و خالص بود. به طور کلی صمغ‌ها در اثر برهمکنش با سایر اجزای بستنی به خصوص پروتئین‌ها، باعث افزایش مقدار pH می‌شوند [۳۲]. ولی با این وجود، پوشش‌های مورد استفاده در این تحقیق، باعث کاهش نسبی pH شدند. هر چند که فیکوسیانیین بدون پوشش، مقدار pH را افزایش داد. در مطالعه کردچوآی و سوراپات (۲۰۱۲) از آب‌پنیر تغلیظ شده به عنوان جایگزین نسبی شیر خشک بستنی استفاده گردید. نتایج نشان داد که آب‌پنیر، pH بستنی را کاهش داده و باعث تقویت فلوکولاسیون پروتئین آب‌پنیر و تبدیل آن از نانومتر به میکرومتر می‌گردد [۳۳]. بنابراین علت کاهش جزئی pH در این مطالعه، احتمالاً بدلیل استفاده از کازئینات سدیم به عنوان پوشش جهت نانو ریزپوشانی کردن فیکوسیانیین بوده است.

بیشترین و کمترین مقدار ویسکوزیته آمیخته، مربوط به تیمار حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده (۱۱۴۰ سانتی پواز) و شاهد (۸۷۰ سانتی پواز) بوده است. اضافه نمودن فیکوسیانیین خالص، تاثیر چندانی بر ویسکوزیته نداشته است. پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و صمغ‌ها، حتی در مقادیر پائین، باعث ایجاد تغییرات قابل ملاحظه‌ای در خصوصیات رئولوژیکی مانند ویسکوزیته ظاهری بستنی می‌شوند. این پدیده ناشی از تشکیل شبکه سه‌بعدی و ایجاد ژل و همچنین قابلیت انعطاف محدود بین واحدهای مونومر در زنجیرهای پلیمری و برهم‌کنش‌هایی است که هنگام پخش شدن آن‌ها بین زنجیرهای پلیمری به وجود می‌آید. ویسکوزیته یکی از عوامل تاثیرگذار بر نرخ ذوب شدن بستنی بوده و باعث بهبود آن می‌گردد [۳۴]. علت افزایش ویسکوزیته در تیمار حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده در مطالعه حاضر، استفاده از پوشش‌های پلی‌ساکاریدی و پروتئینی بوده است. مطالعات نشان داده که اضافه نمودن اسپیرولینا (به عنوان یک افزودنی پروتئینی) به فرآورده‌های لبنی (ماست، دوغ، بستنی) باعث افزایش ویسکوزیته می‌شود [۳۵]. بولیگر و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی اثر صمغ گوار بر خواص کیفی بستنی گزارش کردند که افزودن این صمغ باعث افزایش ویسکوزیته آمیخته بستنی شده و دلیل افزایش ویسکوزیته را کم شدن مقدار آب در دسترس و محبوس شدن آن در آمیخته بیان کردند [۳۶].

بیشترین و کمترین ضریب افزایش حجم مشاهده شده در تیمار شاهد (۴۱/۴۵ درصد) و فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده

(۳۹/۶۵ درصد) بوده است. افزودن فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده باعث کاهش معنی‌داری در مقدار اورران شده که دلیل این کاهش را می‌توان به محبوس شدن مولکول‌های آب توسط پوشش‌های مورد استفاده و افزایش ویسکوزیته نسبت داد. افزایش ویسکوزیته باعث کاهش توانایی در هم‌زدن آمیخته و پراکنده شدن کم‌تر حباب‌های هوا در بستنی می‌گردد. در برخی از موارد، با افزایش بیش از حد ویسکوزیته، اورران نیز حد قابل چشمگیری کاهش یافته و نشان از کارایی پائین ماده پایدارکننده می‌باشد. برخلاف یافته‌های این پژوهش، سوکولیس و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تاثیر صمغ‌های CMC، زانتان، آلژینات و گوار بر خواص کیفی بستنی مشاهده کردند، که افزایش این صمغ‌ها باعث افزایش در مقدار اورران می‌شود [۲۴]. بهرام‌پور و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تاثیر صمغ‌های مختلف بر ماست منجمد اعلام کردند که افزودن صمغ گوار به این محصول تا سطح ۰/۱۵ درصد باعث افزایش اورران ولی در سطوح بالاتر به دلیل بیشتر شدن ویسکوزیته باعث کاهش اورران می‌شود [۳۷]. مهدیان و کاراژیان (۱۳۹۲) افزایش ویسکوزیته و کاهش اورران را به موازات افزایش درصد استفاده از اینولین در فرمولاسیون بستنی کم چرب گزارش کردند [۲۱]. امیری عقدایی و همکاران (۱۳۹۱) نیز در پژوهشی مشابه نشان دادند که افزایش میزان استفاده از صمغ اسفرزه در فرمولاسیون بستنی، با کاهش اورران همراه خواهد بود [۳۸]. در مطالعه رسولی و همکاران (۲۰۱۷) مشخص گردید که بدنال استفاده از اسپیرولینا، اورران به طور چشمگیری کاهش یافت [۳۲]. به نظر می‌رسد ریشه تناقضات مشاهده شده در ارتباط با روند تغییرات اورران با افزایش میزان پایدارکننده را باید در تاثیر ویسکوزیته ایجاد شده به وسیله این ترکیبات بر اورران جستجو کرد.

نتایج تحقیق جاری موید آن است که کمترین میزان سفتی بر حسب نیوتن در تیمار حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده با ۱۵/۲۳ نیوتن و بیشترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با مقدار ۱۸/۷۸ نیوتن بوده و به نظر می‌رسد اضافه کردن فیکوسیانیین و پوشش‌ها باعث نرم شدن بافت بستنی شد. سفتی بافت بستنی به عنوان یک فاکتور شاخص، در اندازه‌گیری رشد کریستال‌های یخ در نظر گرفته می‌شود [۲۴] و هرچه مقدار آن کم‌تر باشد نشان‌دهنده رشد کم‌تر کریستال یخ است. پوشش‌های صمغی و پلی‌ساکاریدی، با افزایش ویسکوزیته و خاصیت ژلی، قادر به کنترل رشد کریستال‌های یخ بوده و این عمل را با کنترل نفوذ آب به درون کریستال‌های یخ انجام می‌دهند. در حقیقت این

کردند که با افزایش غلظت این هیدروکلوئیدها در اثر افزایش غلظت فاز سرمی سرعت ذوب نمونه‌ها کاهش پیدا می‌کند [۲۴]. کردچوآی و سوراپات (۲۰۱۲) گزارش کردند که آب‌پنیر ۰/۵ درصد باعث کاهش درصد ذوب در بستنی می‌شود [۳۳]. نتایج شاخص‌های حسی نشان داده‌شده در جدول ۴ مویده آن است که فاکتور رنگ در تیمار حاوی فیکوسیانیین خالص بیشترین امتیاز را بخود اختصاص داده و بعد از آن تیمارهای فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده و شاهد قرار داشته‌اند. استفاده از پوشش‌های اختصاصی جهت ریزپوشانی‌کردن فیکوسیانیین، باعث کاهش رنگ آبی تیره فیکوسیانیین شده و در مقایسه با فیکوسیانیین خالص از مقبولیت کم‌تری برخوردار بوده است. طعم بستنی در تیمارهای حاوی فیکوسیانیین بهتر از تیمارهای بوده است. به لحاظ نرم‌ترشدن بافت بستنی در تیمارهای حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده، این تیمار از نظر پارامتر سفتی، بیشترین امتیاز را بخود اختصاص داده و با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بوده است. شدت کریستالی، همچنین شدت صمغیت و سردی بستنی در تیمارهای حاوی فیکوسیانیین کمتر از تیمار شاهد بوده و در نتیجه امتیازات کسب شده برای تیمارهای حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده و خالص بیشتر از تیمار شاهد بوده است. افزایش ویسکوزیته عامل اصلی بهبود پارامترهای اخیر می‌باشد. در مطالعه کردچوآی و سوراپات (۲۰۱۲) مشخص گردید که آب‌پنیر تغلیظ‌شده باعث بهبود پارامترهای حسی بستنی (طعم، کریستالی شدن، صمغیت، پوشش دهانی) شده [۳۳] که مشابه مطالعه حاضر بوده و نشان از کارایی بالای فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده با کازئینات سدیم و مالتودکسترین در بهینه‌سازی خواص حسی بستنی دارد. در تحقیق ال زینی و همکاران (۲۰۱۶) از آب‌پنیر تغلیظ‌شده (نمونه شاهد و ۱ درصد) جهت ارزیابی تغییرات بافتی بستنی در زمان‌های صفر و ۱۴ روز استفاده شد و نتایج نشان داد که تغییرات بافتی شامل سختی، چسبندگی، صمغیت و جویدن در نمونه‌های شاهد و حاوی آب‌پنیر بعد از ۱۴ روز، بجز چسبندگی، افزایش داشته اما روند تغییرات در نمونه حاوی آب‌پنیر، کم‌تر بوده و در نتیجه محصول تولیدشده از مقبولیت بیشتری برخوردار می‌باشد [۴۱]. در تحقیق حاضر نیز به لحاظ استفاده از پوشش‌های سازگار با فرمولاسیون بستنی (مالتودکسترین و کازئینات سدیم)، محصول تولیدشده از نظر حسی بهتر از نمونه شاهد بود و بیشتر مورد توجه قرار گرفت. در تیمار حاوی

مواد به عنوان مواد محافظ سرما عمل می‌کنند [۲۴]. پوشش‌های مورد استفاده در این مطالعه طبق مکانسیم فوق و با افزایش ویسکوزیته، باعث کاهش سفتی بستنی شده و از رشد کریستال‌های یخ جلوگیری می‌کنند. میلانی و کوچکی (۲۰۱۱) در بررسی تأثیر گوار بر بافت ماست منجمد به این نتیجه رسیدند که استفاده از گوار در فرمولاسیون ماست منجمد با افزایش غلظت فاز غیر منجمد باعث کاهش سفتی بافت بستنی می‌شود [۳۹].

بیشترین و کم‌ترین درصد ذوب بستنی مشاهده‌شده در این تحقیق مربوط به تیمار شاهد و فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده به ترتیب با ۷۶/۴۵ درصد و ۷۲/۲۸ درصد بوده است. با اضافه‌نمودن فیکوسیانیین و پوشش‌های مالتودکسترین و کازئینات سدیم، درصد ذوب بستنی به طور معنی‌داری کاهش داشته است. مقدار ذوب بستنی تأثیر بسزایی بر ویژگی‌های حسی بستنی خواهد داشت [۳۹]. تغییرات این فاکتور، به نوع و مقدار ماده پایدارکننده بستگی دارد. به طور کلی، سرعت ذوب‌شدن بستنی تحت تأثیر فاکتورهای متعددی مانند مقدار هوای واردشده، طبیعت کریستال‌های یخ و نیز شبکه گلوله چربی است که حین انجماد شکل می‌گیرد [۲۲].

طی ذوب‌شدن، حرارت محیط تدریجاً از قسمت خارجی به قسمت داخلی بستنی نفوذ کرده و موجب ذوب‌شدن کریستال‌های یخ می‌شود. آب حاصل از ذوب کریستال‌های یخ، در فاز سرمی غیرمنجمد، پخش شده و سپس مخلوط رقیق‌شده از بین ساختار کفی بستنی عبور کرده و در انتها، اصطلاحاً چکه می‌کند و به عبارتی جریان می‌یابد [۲۲].

پایدارکننده‌ها با ایجاد ویسکوزیته، موجب کاهش تحرک مولکول‌های آب و حرکت آزادانه آن‌ها میان مولکول‌های مخلوط می‌شوند و بدین ترتیب باعث بهبود مقاومت به ذوب بستنی می‌شوند. به علاوه، گفته می‌شود که یکی از مهم‌ترین عوامل موثر بر کاهش مقاومت به ذوب بستنی، ناپایداری فاز چربی آن می‌باشد [۴۰]. به نظر می‌رسد یکی از عوامل موثر در کاهش مقدار ذوب بستنی در تیمار حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی‌شده در مطالعه حاضر، توان امولسیفایری بین فیکوسیانیین و کازئینات سدیم با چربی موجود در شیر بوده که باعث مقاومت در برابر ذوب‌شدن می‌گردند. میلانی و کوچکی (۲۰۱۱) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که افزودن صمغ گوار به ماست منجمد باعث کاهش سرعت ذوب ماست منجمد می‌شود [۳۹]. سوکولیس و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تأثیر صمغ‌های زانتان، گوار، سدیم آلزینات و CMC اعلام

خواص کیفی و حسی محصول شد، می‌توان از این رنگدانه بخصوص به فرم نانو (به دلیل پایداری در شرایط مختلف) در تولید نوشیدنی، ژله و بستنی به عنوان بهبوددهنده بافت و رنگ‌دهنده بیولوژیک استفاده کرد.

## ۶- تشکر و قدردانی

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و همچنین پژوهشکده اکولوژی دریای خزر جهت حمایت مالی و در اختیار نهادن تجهیزات تخصصی تقدیر و تشکر به عمل آورند.

## ۷- منابع

- [1] Rymbai, H., Sharma, R. R., and Srivastav, M. Bio-colorants and its implications in health and food industry—a review. *International Journal of Pharmacological Research*, 2011; 3(4): 2228-2244.
- [2] Nuhu, A. A. Spirulina (Arthrospira): An important source of nutritional and medicinal compounds. *Journal of Marine biology*, 2013.
- [3] Nagpal, N., Munjal, N., and Chatterjee, S. Microbial pigments with health benefits—a mini review. *Trend in Biosciences*, 2011; 4: 157-160.
- [4] Nemoto-Kawamura, C., Hirahashi, T., Nagai, T., Yamada, H., Katoh, T., and Hayashi, O. Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 2004; 50(2): 129-136.
- [5] Romay, C. H., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., and Rimbau, V. C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current protein and peptide science*, 2003; 4(3): 207-216.
- [6] Sonani, R. R., Singh, N. K., Kumar, J., Thakar, D., and Madamwar, D. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochemistry*, 2015; 49(10): 1757-1766.

فیکوسیانیین خالص، بیشترین تغییرات در رنگ محصول بوده و سایر تغییرات چندان مشهود نمی‌باشد.

در مطالعه پاندیان و همکاران (۲۰۱۲) از آب پنیر با غلظت ۰/۴۶ درصد استفاده شد و نتایج نشان داد که تیمار دارای آب پنیر باعث بهینه‌نمودن کیفیت بستنی می‌شود [۴۲] که با نتایج آزمایشات انجام شده در این تحقیق مطابقت دارد. در مطالعه سونوان و همباده (۲۰۱۴) از مالتودکسترین به عنوان جایگزین خامه (با مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) جهت تهیه بستنی کم‌کالری استفاده شده و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت مالتودکسترین، فاکتورهای حسی رنگ، بو، طعم و مزه در تیمارهای دارای مالتودکسترین بهتر از تیمار شاهد است و تیمار ۳۰ درصد، بهترین نتایج را نشان داد [۴۳]. نتایج مطالعه کومار و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که افزودن پوشش کازئینات سدیم حاوی نانوکپسول‌های کورکومین (جزء رنگی زردچوبه) به بستنی، باعث بهبود طعم بستنی می‌شود [۱۹]. گوبی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که به هنگام استفاده از بتاکاروتن ریزپوشانی شده در بستنی، تغییرات حسی در بستنی فرمول شده از مقبولیت بیشتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار است [۴۴]. در انتخاب مواد مورد استفاده به عنوان افزودنی یا جایگزین ماده دیگر، بایستی به غلظت، نوع ماده، سازگاری آن با ماده غذایی پایه توجه کرد تا در ویژگی‌های کیفی و حسی محصول نهایی تغییر نامطلوبی ایجاد نشود. در مطالعه حاضر از غلظت ۰/۲۵ درصد از مالتودکسترین، ۰/۲۵ درصد کازئینات سدیم و ۱۰۰ میکروگرم فیکوسیانیین استفاده شد.

با در نظر گرفتن تمامی فاکتورهای مورد بررسی، تیمار حاوی فیکوسیانیین خالص تغییرات معنی‌داری بر شاخص‌های کیفی و حسی بجز رنگ نداشته و تیمار حاوی فیکوسیانیین نانو ریزپوشانی شده در زمان‌های مورد بررسی از مقبولیت قابل قبولی برخوردار بوده است. هر چند که فاکتور رنگ در تیمار حاوی فیکوسیانیین خالص بهتر از سایر تیمارها گزارش شد.

## ۵- نتیجه گیری کلی

نانوریزپوشانی فیکوسیانیین با استفاده از مالتودکسترین و کازئینات سدیم موجب کاهش معنی‌دار نرخ رهاش هسته در شرایط آزمایشگاهی مشابه شرایط دستگاه گوارش می‌شود. از آنجا که استفاده از هر دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی شده فیکوسیانیین در فرمولاسیون بستنی موجب ارتقا و بهبود

- [16] Murugan, T., and Rajesh, R. Cultivation of two species of *Spirulina* (*Spirulina platensis* and *Spirulina platensis* var lonar) on sea water medium and extraction of C-phycocyanin. *European Journal of Experimental Biology*, 2014; 4(2): 93-97.
- [17] Leema, J. M., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S., and Karthikayulu, S. High value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater. *Bioresource technology*, 2010; 101(23): 9221-9227.
- [18] Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S., and Raghavarao, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of chromatography A*, 2006; 1127(1-2): 76-81.
- [19] Kumar, D. D., Mann, B., Pothuraju, R., Sharma, R., and Bajaj, R. Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. *Food & function*, 2016; 7(1): 417-424.
- [20] Akalin, A. S., and Erişir, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *Journal of food science*, 2008; 73(4): M184-M188.
- [21] Mahdian, E., Karajian, R., and Sabri, S. The effect of milk fat replacement with inulin and milk protein concentrate on physicochemical and sensory properties of low fat ice cream. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 2013; 5 (4): 21-29
- [22] Amiri, Z., and Ahmadi, M. The possibility of substitution of carboxy methyl cellulose and tragacanth gum on the physical and sensory properties of ice cream. *Journal of Food Research*, 2014; 24 (2): 279-290
- [23] Marshall R.T., and Arbuckle W.S. *The science of Ice cream*. 5<sup>th</sup>ed. Torkashvand, Y. Eta. Tehran; 1996.
- [24] Soukoulis, C., Chandrinou, I., and Tzia, C. Study of the functionality of selected hydrocolloids and their blends with κ-carrageenan on storage quality of vanilla ice cream. *LWT-Food Science and Technology*, 2008; 41(10), 1816-1827.
- [25] Pon, S. Y., Lee, W. J., and Chong, G. H. Textural and rheological properties of stevia ice cream. *International Food Research Journal*, 2015; 22(4): 1544-1549.
- [26] Hettiarachchi, C. A., and Illeperuma, D. C. K. Developing a trained sensory panel for comparison of different brands of vanilla ice cream using descriptive sensory
- [7] Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., and Ferrari, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 2014; 49(1), 154-159.
- [8] Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., and Skibsted, L. H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 2005; 220(3), 261-266.
- [9] Yan, M., Liu, B., Jiao, X., and Qin, S. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioprocess technology*, 2014; 92(1), 89-97.
- [10] Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S., and Souza-Soares, L. A. Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*, 2014; 21(6): 2201.
- [11] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., and Bugarski, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 2011; 1806-1815.
- [12] Salehifar, M., Shahbazizadeh, S., Khosravi, K., Bahmadi, H., and Ferdowsi, R. Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 2013; 7 (4): 63-72
- [13] Agustini, T. W., Ma'ruf, W. F., & Wibowo, B. A. Study on the effect of different concentration of *Spirulina platensis* paste added into dried noodle to its quality characteristics. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2017; (Vol. 55, No. 1, p. 012068). IOP Publishing.
- [14] Kamble, S. P., Gaikar, R. B., Padalia, R. B., and Shinde, K. D. Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2013; 3(8): 149-153
- [15] Prabakaran, P., and Ravindran, A. D. Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences*, 2013; 1(1): 15-20.



- Innovative Food Technologies, 2015; 5 (2): 59-70.
- [36] Bolliger, S., Wildmoser, H., Goff, H. D., and Tharp, B. W. Relationships between ice cream mix viscoelasticity and ice crystal growth in ice cream. *International Dairy Journal*, 2000; 10(11), 791-797.
- [37] Bahramparvar, M., Hadad, M., and Razavi, M. Effect of selected stabilizers on physicochemical and sensory properties of ice cream. *Journal of Food Processing and Production*, 2011; 1 (1): 4-14
- [38] Amiri, S., Alami, M., Rezai, R., Dadpour, M., and Khamiri, M. Effect of isfarzeh and basil seed mucilages on physicochemical rheological and sensory properties of ice cream. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 2012; 1 (1): 23-36
- [39] Milani, E., and Koocheki, A. The effects of date syrup and guar gum on physical, rheological and sensory properties of low fat frozen yoghurt dessert. *International Journal of Dairy Technology*, 2011; 64(1): 121-129.
- [40] Muse, M. R., and Hartel, R. W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. *Journal of dairy science*, 2004; 87(1): 1-10.
- [41] El-Zeini, H. M., El-Abd, M. M., Mostafa, A. Z., and El-Ghany, F. H. Y. Effect of incorporating whey protein concentrate on chemical, rheological and textural properties of ice cream. *Journal of Food Processing and Technology*, 2016; 7(2): 1-7
- [42] Pandiyan, C., Villi, R. A., Kumaresan, G., and Elango, G. R. A. Effect of incorporation of whey protein concentrate on quality of ice cream. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2012; 8(4), 189-193 .
- [43] Sonwane, R. S., and Hembade, A. S. Sensorial quality of dietetic soft serve ice cream prepared by using different proportions of maltodextrin. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2014; 2(6): 51-55 .
- [44] Gobbi J., Carvalho T. and Cristina, S. Characterization and evaluation of sensory acceptability of ice creams incorporated with beta-carotene encapsulated in solid lipid microparticles, *Food Science and Technology*, 2016; 36(4): 664-671.
- analysis. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 2015; 43(1): 45-55.
- [27] Saranraj, P., and Sivasakthi, S. Spirulina platensis–food for future: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2014; 4(1), 26-33.
- [28] Dewi, E. N., Purnamayati, L., and Kurniasih, R. A. Antioxidant activities of phycocyanin microcapsules using maltodextrin and carrageenan as coating materials. *Jurnal Teknologi*, 2016; 78(4): 45–50.
- [29] Dewi, E. N., Purnamayati, L., and Kurniasih, R. A. Physical characteristics of phycocyanin from spirulina microcapsules using different coating materials with freeze drying method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 55, No. 1, p. 012060), 2017; IOP Publishing.
- [30] Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., and de Menezes, C. R. Development and characterization of alginate microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT-Food Science and Technology*, 2016; 71: 302-308.
- [31] Suzery, M., Majid, D., Setyawan, D., and Sutanto, H. Improvement of stability and antioxidant activities by using phycocyanin-chitosan encapsulation technique. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 55, No. 1, p. 012052), 2017; IOP Publishing.
- [32] Rasouli, F., Berenji, sh., and Shahab, A. Optimization of traditional Iranian ice cream formulation containing spirulina microalgae using response surface methodology, *Journal of Food Technology and Nutrition*, 2017; 4 (3): 18-28
- [33] Kerdchouay, P., and Surapat, S. Effect of skimmed milk substitution by whey protein concentrate in low-fat coconut milk ice cream. *Journal of Food Process Technology*, 2012; 16(2): 25-34.
- [34] Gohari, A., Habibi, M., and Hadad, M. Effect of date syrup as a substitute for sugar on the physicochemical and sensory properties of soft ice cream. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 2005; 1 (2): 23-32
- [35] Eslami, A., Fadaei, V., Khosravi, K., and Mazinani, S. The effect of powdered Spirulina platensis biomass on some physicochemical and sensory properties of probiotic dough containing powdered mint.



## Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina* (*Spirulina platensis*) and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation

Safari, R. <sup>1\*</sup>, Raftani Amiri, Z. <sup>2</sup>, Reyhani Poul, S. <sup>3</sup>, Ghaffari, H. <sup>4</sup>

1. Assistant professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Sari, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. PhD Graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4. Assistant professor, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2021/ 12/ 09

Accepted 2022/ 01/15

#### Keywords:

Spirulina,  
Phycocyanin,  
Nanoencapsulation,  
Ice cream,  
Quality and sensory properties

**DOI:** 10.52547/fsct.19.123.145

**DOR:** 20.1001.1.20088787.1401.19.123.24.9

\*Corresponding Author E-Mail:  
Safari1351@gmail.com

### ABSTRACT

Due to the concerns about the use of artificial colors in various foods, it is necessary to pay attention to sources with natural colors. One of these sources is the algae *Spirulina*, which contains the blue pigment phycocyanin. The aim of the present study in the first stage was to extract this pigment from the algae by enzymatic method (lysozyme) and its nanoencapsulation. In the second stage, the physicochemical properties of nanoparticles were investigated. Finally, phycocyanin in both free and nano forms was added to the ice cream formulation and the qualitative and sensory properties of the product were evaluated in comparison with the control. The results showed that the produced nanoparticles have an average size of 397.1 nm. The encapsulation efficiency of the process was recorded  $73.41 \pm 2.11\%$ . According to the images recorded using scanning electron microscopy, the nanoparticle with different dimensions are scattered in the microscopic spread so that the particles are visible in different sizes (diameter 51.4 to 221/2 nm). The release results of nanoparticles in vitro showed that at pH=1.2, the release percentage of phycocyanin is low (the first 2 hours). So that it fluctuates in the range of 7 to 13%. But after this stage (pH=7.4), the release rate increased significantly (second 4 hours) and from 35 to 71% at 3 and 4 hours, respectively. The use of pure phycocyanin in ice cream formulation improved the hardness, melting percentage, texture, hardness, crystalline intensity and coldness. But these indices were reported at a more favorable level in the treatment formulated with nanoencapsulated phycocyanin. The color index in ice cream formulated with pure phycocyanin was more desirable and more acceptable compared to the treatment with nanoencapsulated phycocyanin. Due to the properties of phycocyanin, especially the nanoencapsulated form, it can be used as a biological dye and improve the quality and sensory properties in various ice creams.